

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 797–805

Der Einsatz der Lasernephelometrie zur Bestimmung und rechnerunterstützten Auswertung der Fibronectinkonzentration in verschiedenen Körperflüssigkeiten

Von A. M. Gressner und P. Wallraff

Abteilung Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium der Medizinischen Fakultät der RWTH, Aachen

(Eingegangen am 3. März/2. Juli 1980)

Zusammenfassung: Es wird über eine lasernephelometrische Methode zur Bestimmung der Fibronectinkonzentration in verschiedenen menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten berichtet. Das Verfahren erweist sich als präzise (VK in der Serie 2,1%), empfindlich (untere Nachweisgrenze 1,2 mg/l Fibronectin), schnell, relativ einfach und voll mechanisierbar. Mittels programmierbarer Rechner ist eine elektronische Auswertung der Streulichtsignale möglich. Die mit der Lasernephelometrie und der radialen Immundiffusion bestimmten Antigenkonzentrationen weisen einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,859$ auf.

In Plasmen gesunder Männer wurde eine mittlere Fibronectinkonzentration von 291 mg/l, bei Frauen eine signifikant niedrigere Konzentration von 259 mg/l gefunden. Bei Carcinomen des weiblichen Genitaltraktes und bei Morbus Crohn lassen sich Erhöhungen der Fibronectinkonzentration im Plasma feststellen. Synovialflüssigkeiten entzündlicher Genese weisen signifikant höhere Konzentrationen (318 mg/l) auf als die nicht-entzündlichen Ursprungs. In Seminalplasmen konnte bei starker individueller Streuung Fibronectin in dem Plasma vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen werden. Extrem niedrige Antigenkonzentrationen (0,41 mg/l) fanden sich im Liquor cerebrospinalis. Gesunder, unter pathologischen Bedingungen kommt es zu signifikanten, positiv mit der Zellzahl korrelierenden Anstiegen. Ebenfalls niedrige Fibronectinkonzentrationen (16 mg/l) sind in Amnionflüssigkeit am Ende der Gravidität nachweisbar.

The use of laser nephelometry for the determination and computer-assisted calculation of the fibronectin concentration in various body fluids

Summary: We report a laser-nephelometric procedure for the determination of the concentration of fibronectin in various human and animal body fluids. The method is precise (CV intra-assay 2.1%), sensitive (the detection limit is 1.2 mg/l fibronectin), rapid, relatively simple and can be totally mechanized. By use of programmable calculators an electronic evaluation of the scattered light signals is possible. The antigen concentrations determined both by laser nephelometry and radial immunodiffusion show a coefficient of correlation of $r = 0.859$.

In plasma of healthy men the mean concentration of fibronectin is 291 mg/l; women have a significant lower concentration of 259 mg/l. Increased levels of plasma fibronectin were found in patients with carcinomas of the female genital tract and Morbus Crohn. Synovial fluids obtained from inflammatory joint diseases contain significantly higher concentrations of fibronectin (318 mg/l) than those from non-inflammatory joints. The range of concentration of fibronectin in seminal plasma is similar to that in blood plasma, but a large inter-individual variation was observed. Extremely low antigen concentrations (0.41 mg/l) were determined in normal liquor cerebrospinalis, but under pathological conditions a significant increase occurs, which correlates strongly with the cell count. Low levels of fibronectin (16 mg/l) were also found in amniotic fluids at the end of pregnancy.

Einführung

Fibronectin (1), auch unter den Bezeichnungen fibroblast surface antigen (2), galactoprotein A (3), cell surface protein (4), large, external, transformation-sensitive (LETS) protein (5) und cold insoluble globulin (6) bekannt, kommt als hochmolekulares Glykoprotein an

den Oberflächen vorwiegend mesenchymaler Zellen als Bestandteil der Glycocalyx, im extrazellulären Bindegewebe und in extrazellulären Flüssigkeiten vor (für Übersichten siehe l. c. 7–9). Im Plasma tritt es als dimeres, aus zwei nahezu identischen Untereinheiten bestehendes und durch Disulfidbrücken fixiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 440000 und elektro-

phoretischer α_2 -Beweglichkeit auf (10), welches der zellassozierten Form des Fibronectins zwar sehr ähnlich, mit ihr wahrscheinlich jedoch nicht identisch ist (7). Immunologisch zeichnen sich beide Typen durch komplette Kreuzreaktivität aus (2, 11–13).

Die Vielzahl der biologischen Aktivitäten dieses Proteins, wie seine Bindungsaffinität zu Kollagen (14–16), Fibrin und Fibrinogen (17), sein positiver Effekt auf die Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion (18, 19), seine Hämagglutinationseigenschaften (20, 21) und Opsoninaktivität (22), seine vermutete Rolle in der Clearance-Funktion des retikuloendothelialen Systems (23) und seine mögliche Bedeutung bei embryonalen Differenzierungsprozessen (24), sowie die Verminderung des oberflächenassozierten Fibronectins in transformierten (neoplastischen) Zellen (25, 26) haben das klinische Interesse an diesem Plasmaprotein stark ausgedehnt. Damit entstand der Bedarf an einer schnellen, einfachen und zuverlässigen Methode zur quantitativen Bestimmung des Fibronectins im Plasma und in Geweben.

Im Gegensatz zu den früher verwendeten, bestenfalls semiquantitativen Nachweisverfahren durch Immunfluoreszenz oder durch elektrophoretische Auftrennung mit nachfolgender Densitometrie haben sich immunologische Meßprinzipien, wie radiale Immundiffusion (27), Elektroimmundiffusion nach Laurell (28), Radioimmunoassay (1, 29) und Enzymimmunoassay (ELISA) (15) als Methoden mit relativ hoher analytischer Zuverlässigkeit erwiesen. Der Einsatz der Lasernephelometrie, z. B. bei der quantitativen Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum (30, 31), hat gezeigt, daß sich dieses Verfahren grundsätzlich zur schnellen, einfachen und zuverlässigen Einzelproteinbestimmung anbietet (32, 33).

Wir haben dieses Prinzip folglich zur Bestimmung der Fibronectinkonzentration in verschiedenen menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten angewandt und an einigen Beispielen geprüft, ob sich aus veränderten Fibronectinkonzentrationen diagnostisch relevante Aussagen machen lassen.

Material und Methoden

Geräte

Als Grundgerät diente das mit einem 4 mW Helium-Neon-Laser (Wellenlänge 632,8 nm) ausgestattete Nephelometer (Nr. 37250/339) der Behringwerke AG, Marburg/Lahn (34), welches durch eine Transportautomatik mit elektronischer Zeitvorwahl (Behringwerke AG) und durch einen über ein Interface adaptierten programmierbaren Hewlett-Packard-Tischrechner 9815 A ergänzt war. Die Streulichtintensitäten wurden bei manueller Auswertung an einem Digitalvoltmeter abgelesen oder bei elektronischer Auswertung unter Verwendung geeigneter Programme (siehe unten) direkt in die Endkonzentration umgerechnet und ausgedruckt. Die Inkubation und Streulichtmessung erfolgte in LN-Universalküvetten (Behringwerke AG).

Reagenzien

Die Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Antiserum gegen humanes Fibronectin vom Kaninchen (0,79 g Protein/ml, Charge 107202 B, C), Protein-Standardplasma (Charge 1105, 250 mg Fibronectin/l), LC Partigen-Platten für Fibronectin¹⁾ (Charge 3674) und Klärungsmittel für trübe Sera (unter Verwendung von Frigen[®]) von der Fa. Behring AG, Marburg/Lahn; Polyethylenglykol 6000 pract. von Serva Feinbiochemica, Heidelberg; phosphatgepufferte NaCl-Lösung (ohne Magnesium und Calcium) von Flöw Laboratories GmbH, Bonn; humanes Fibronectin (Charge 93457, elektrophoretische Reinheit 85%, 0,8 g/l Cyclohexylaminopropan-Sulfonsäure, pH 11,0) von Collaborative Research, Inc., Waltham, Mass., USA; Hyaluronat 4-glycanohydrolase (EC 3.2.1.35) von Boehringer GmbH, Mannheim; Heparin (Charge 78 C-0203, Na-Salz, aus Intestinalmucosa des Schweines) von Sigma Chemical Comp., München.

Proben

Die Fibronectinkonzentrationen wurden bestimmt in Plasmen offensichtlich (klinisch und biochemisch) gesunder Personen (Blutspender, Studenten, Mitarbeiter der Klinik) zur Erstellung des Referenzbereiches sowie in den in das Zentrallaboratorium gelangten, durch eindeutige Diagnosen ausgewiesenen pathologischen Plasmen. Die Proben wurden bis zur Analyse, die überwiegend innerhalb von 24 Stunden nach Specimennahme erfolgte, bei 4 °C gelagert.

Synovialflüssigkeit wurde durch Punktion ätiologisch unterschiedlicher Gelenkergüsse gewonnen und nach Abzentrifugation zellulärer Bestandteile bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben durch Inkubation mit 25 µg (ca. 25 Einheiten) Schaftestes-Hyaluronidase pro ml Synovialflüssigkeit für 5 Minuten bei 37 °C in der früher beschriebenen Weise depolymerisiert (35).

Seminalplasma wurde aus dem zum Zwecke der Fertilitätsdiagnostik gewonnenen Ejakulat nach Abzentrifugation der Zellen hergestellt und ohne längere Probenlagerung direkt zur Untersuchung eingesetzt.

Zur Fibronectinbestimmung verwendeten Volumina Amnionflüssigkeit und Liquor cerebrospinalis waren jeweils ein Teil der zu anderen klinisch-diagnostischen Zwecken durch Amniozentese bzw. Lumbalpunktion abgenommenen Körperflüssigkeiten.

Zur Gewinnung von Rattenplasma wurden äthernarkotisierten männlichen Sprague-Dawley Ratten etwa 5 ml Blut aus der V. cava inf. entnommen und in EDTA-Blutbildröhrchen antikoaguliert.

Durchführung der Fibronectinbestimmung

Mit Ausnahme der in den Legenden der entsprechenden Abbildungen und Tabellen beschriebenen Modifikationen war das grundsätzliche Vorgehen bei der lasernephelometrischen Bestimmung der Fibronectinkonzentration wie folgt:

2 bis 5 ml Blut wurden unmittelbar nach Entnahme in Ethylendiamintetraacetat-(EDTA-) beschichteten Röhrchen (Fa. Sarstedt, Art. Nr. 328) antikoaguliert und zentrifugiert. 0,5 ml des hämolysefreien Plasmas wurden mit Klärungsmittel behandelt (36, 37) und 100 µl des geklärten Plasmas 1:51 mit filtrierter (Millex disposable filters, Millipore GmbH, Neu-Isenburg) 0,154 mol/l NaCl-Lösung verdünnt. 100 µl des verdünnten Plasmas wurden in LN-Küvetten, deren Eigenstreuung vorher geprüft wurde, mit 100 µl des 1:5 verdünnten Fibronectin-Antiserums für genau 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und zur Streulichtmessung eingesetzt. Bei seriellen Bestimmungen erfolgte die Zugabe von Antiserum und Messung im 15 s Intervall.

Die Leerwerte (in Volt) waren für die Küvetten 0,04, für filtrierte NaCl 0,06, für verdünntes Antiserum 0,22 und verdünntes, geklärtes Plasma 0,08.

Zur Erstellung der Referenzkurve wurden die Streulichtintensitäten geometrischer Verdünnungen von 1:13 bis 1:208 des

¹⁾ Kein offizielles Verkaufsprodukt der Behringwerke.

geklärten Protein-Standardplasmas (250 mg/l Fibronectin) mit filtrierter physiologischer NaCl-Lösung gemessen und auf Millimeterpapier ausgewertet. Diese Kurve diente auch zur Grundlage der rechnerunterstützten Auswertung.

Zur Fibronectinbestimmung durch radiale Immundiffusion wurde geklärtes EDTA-Plasma 1:3 mit 0,154 mol/l NaCl verdünnt. 20 µl dieser Verdünnung wurden aufgetragen und 3 Tage inkubiert. Die Standardkurve wurde mit unverdünntem (250 mg/l), 1:2 (125 mg/l) und 1:4 (62,5 mg/l) verdünntem Standardhumanplasma (Charge 1105) erstellt. Die Auswertung erfolgte nach dem üblichen Verfahren.

Allgemeine Analysen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde mit der Biuret-Methode (38), Zellzählungen und -differenzierungen nach klinisch-chemischen Standardverfahren durchgeführt.

Statistische Verfahren

Zur Ermittlung des Referenzbereiches wurde das vom Verteilungstyp der Meßwerte unabhängige nicht-parametrische Testverfahren nach *Murphy* (39) angewandt. Signifikanzen wurden geprüft entweder mit dem t-Test für unverbundene und verbundene Stichproben oder mit dem *Wilcoxon*-Test (40).

Ergebnisse

Methodik

Die Inkubation einer Plasmaverdünnung mit Fibronectin-Antiserum führt zu einer zeitabhängigen Zunahme der Intensität des gestreuten Laserlichtes (Abb. 1). Nahezu maximale Streulichtsignale werden nach einer Inkubationsdauer von 60 min erreicht. Als Ausdruck einer Sedimentation der Immunkomplexe beginnt das Streulicht bei hohen Fibronectinkonzentrationen in der Küvette (9,6 mg/l) 75 min nach Beginn der Inkubation wieder zu fallen, während bei niedrigeren, im physiologischen Bereich liegenden Konzentrationen (2,98 mg/l) die Spannung bis mindestens 120 min stabil ist. Verlängerungen der üblichen Inkubationszeit von 60 min sind somit ohne Einfluß auf den Meßwert, wohingegen bei einer Inkubationsdauer von 45 min durchschnittlich um

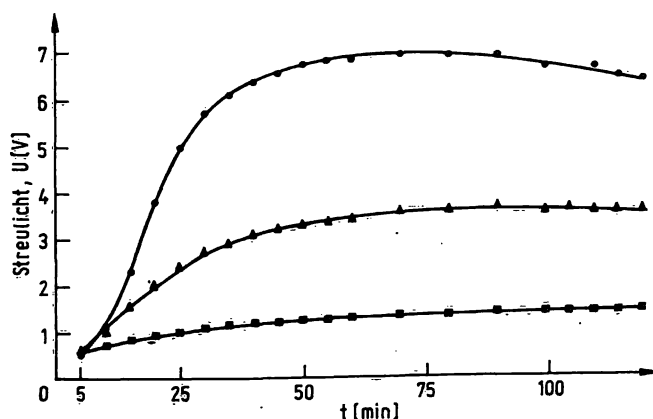


Abb. 1. Kinetik der Immunkomplexbildung zwischen Plasma-Fibronectin und Antiserum. Protein-Standardplasma wurde in den Verdünnungen 1:13, 1:42 und 1:130 eingesetzt, so daß Fibronectinkonzentrationen von 9,6 mg/l (●—●), 2,97 mg/l (▲—▲) und 0,96 mg/l (■—■) im Inkubationsansatz resultierten.

10% niedrigere Streulichtsignale registriert werden (Abb. 1). Bei Verwendung von *Dulbecco's* phosphatgepufferter Lösung anstelle von ungepufferter physiologischer NaCl-Lösung zur Plasmaverdünnung werden reduzierte Streulichtsignale erhalten, wobei das Ausmaß der Erniedrigung abhängig ist von der Antigenkonzentration in der Küvette und von der Inkubationsdauer (Abb. 2). So liegen nach 120 min bei einer Konzentration von 2,97 mg/l Fibronectin die Meßwerte mit phosphatgepufferter Salzlösung etwa um 15% unter den mit 0,154 mol/l NaCl erhaltenen. Der Abbildung 2 ist weiterhin zu entnehmen, daß der Zusatz von Polyethylenglykol 6000 in einer Konzentration von 20 g/l Küvetteninhalt in beiden Arten von Inkubationsmedium zu einer deutlichen Erhöhung des Streulichtes führt (bei 2,97 mg/l Fibronectin und einer Inkubationsdauer von 60 min um 53%), wohingegen die Kinetik der Immunkomplexbildung nahezu unbeeinflusst bleibt.

Die Intensität des Streulichtes verändert sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Antigenmenge in einer für *Heidelberger*-Kurven typischen Weise (Abb. 3). Mit Verlängerung der Inkubationsdauer von 15 min auf 120 min kommt es bei sehr niedrigen Antigenkonzentrationen in der Küvette (z.B. 0,7 mg/l) zu einer 100%igen Erhöhung des Streulichtes und damit zu einer Anhebung der unteren Nachweisgrenze. Mit zunehmender Inkubationsdauer wird außerdem eine Vergrößerung des Meßbereiches durch Verschiebung des Äquivalenzpunktes zu höheren Antigenkonzentrationen (von 10 mg/l bei 15minütiger zu 18 mg/l bei 60minütiger Inkubation) erreicht (Abb. 3). Unter Berücksichtigung einer Mindestfüllmenge der Küvette von 150 µl ist es möglich, lasernephelometrisch 1,2 mg Fibronectin pro l Körperflüssigkeit (entsprechend 90 ng Antigen in der Küvette) zuverlässig nachzuweisen, eine Empfindlichkeit, die durch Zusatz von Polyethylenglykol (siehe oben) noch zu steigern ist.

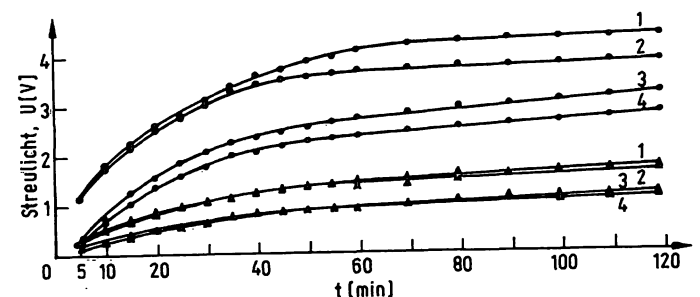


Abb. 2. Kinetik der Immunkomplexbildung zwischen Fibronectin und Antiserum in Abhängigkeit von der Art der Verdünnungslösung des Plasmas mit und ohne Polyethylenglykol. Protein-Standardplasma wurde wie in Abbildung 1 beschrieben verdünnt, um Fibronectinkonzentrationen in der Küvette von 2,97 mg/l (●—●) und 0,96 mg/l (▲—▲) zu erhalten. Die Verdünnung erfolgte entweder mit 0,154 mol/l NaCl (1, 3) oder mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (2, 4), die entweder 20 g/l (1, 2) oder kein (3, 4) Polyethylenglykol enthielten.

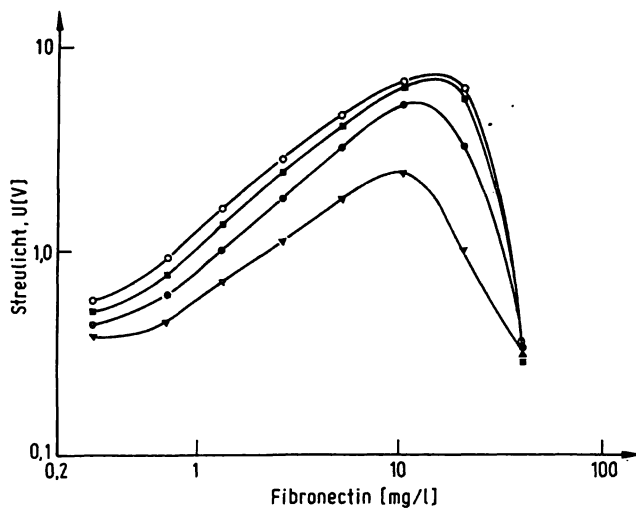


Abb. 3. Immunkomplexbildung zwischen Fibronectin und Antiserum in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration in der Küvette.
Die Streulichtmessung erfolgte nach einer Inkubationszeit von 15 min (\triangle — \triangle), 30 min (\bullet — \bullet), 60 min (\blacksquare — \blacksquare) und 120 min (\circ — \circ).

Eine typische Referenzkurve für einen Antigenbereich von 0,6–9,6 mg/l Küvetteninhalt, der etwa die untere Hälfte des aufsteigenden Teiles der *Heidelberger-Kurve* repräsentiert, zeigt Abbildung 4. 95% der für ein gesundes Referenzkollektiv ermittelten Streulichtsignale für Fibronectin im Plasma kommen auf den unteren 40% der Referenzkurve zu liegen. Damit ist gewährleistet, daß auch bei stark erhöhten pathologischen Fibronectinkonzentrationen im Plasma bzw. bei hohen Antigen-

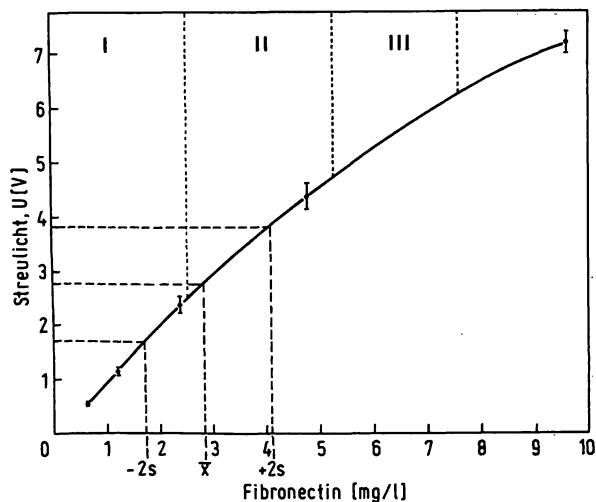


Abb. 4. Referenzkurve für Plasma-Fibronectin.
Protein-Standardplasma wurde in den Verdünnungen 1:13, 1:26, 1:52, 1:104 und 1:208 mit 100 μ l Antiserum für 60 min inkubiert. Mittelwert \pm 2 s. Bereich der Streulichtsignale und Fibronectinkonzentrationen in der Küvette für ein Kollektiv von 110 gesunden Kontrollpersonen sind angegeben.
Die Abschnitte I bis III markieren die Bereiche der Standardkurve, für die zum Zwecke der rechner-unterstützten Auswertung Regressionsgeraden berechnet wurden.

konzentrationen in anderen Körperflüssigkeiten bei unveränderter Vorverdünnung (1:51) stets im Antikörperexzeß gemessen wird. Die zur Ermittlung der Referenzkurve hergestellten Plasmaverdünnungen sind über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen stabil.

Über die bei der lasernephelometrischen Bestimmung von Fibronectin im Plasma erreichten Präzisionen informiert Tabelle 1. Zur Durchführung von Präzisionskontrollen sind grundsätzlich bei -20°C aufbewahrte Aliquots eines Humanplasmapools geeignet, doch können alternativ dazu einige der in Tabelle 2 untersuchten Kontrollseren herangezogen werden. Da ihre Fibronectinkonzentrationen (mit Ausnahme von Standardhumanplasma) im allgemeinen wesentlich niedriger als im Humanplasma sind, können nur durch entsprechend geringere Vorverdünnungen dem 1:51 verdünnten Humanplasma vergleichbare Streulichtsignale erhalten werden. Eine größere Anzahl von Kontrollseren scheint jedoch (nahezu) kein Fibronectin zu enthalten (Tab. 2).

Die Wiederfindungsrate des Antigens in einer kommerziell erhältlichen Lösung von Humanfibronectin beträgt 52%, wenn die vom Hersteller angegebene Antigenkonzentration zugrunde gelegt wird.

Die Ergebnisse eines statistischen Vergleichs zwischen Lasernephelometrie und radialer Immundiffusion sind in Abbildung 5 zusammengefaßt. Die Präzisionen der Fibronectinbestimmung ($n = 14$) mittels radialer Immundiffusion sind gekennzeichnet durch einen Variationskoeffizient von 2,4% (in der Serie) und 5,5% (von Tag zu Tag) bei einer Antigenkonzentration von 125 mg/l. Auch mit dieser Methode beträgt die Wiederfindung in der oben genannten Fibronectinlösung nur 52%.

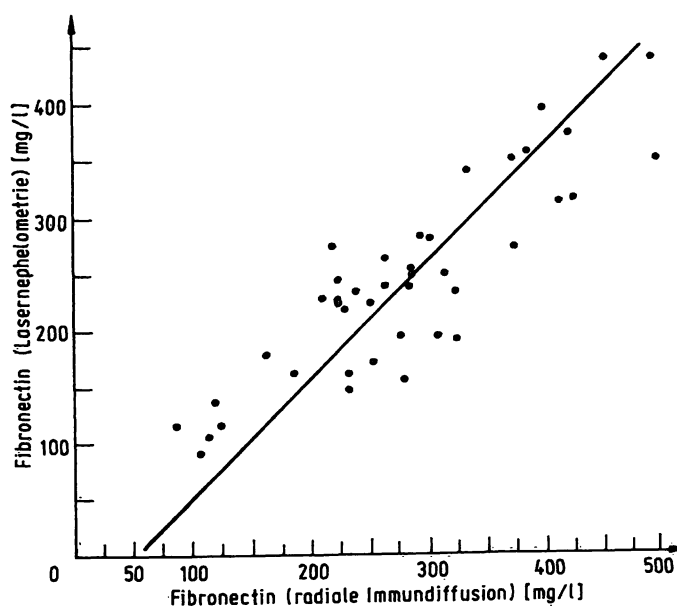
Die Art der Probenverwahrung (bei Raumtemperatur, $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C) ist über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen ohne signifikanten Einfluß auf die gemessene Fibronectinkonzentration. Lagerung der Proben bei -20°C über 6 Monate verändert den Meßwert nicht. In Übereinstimmung mit früheren Befunden (41, 42) ergeben sich im Serum durchschnittlich um 18% niedrigere Fibronectinkonzentrationen als im EDTA-Plasma

Tab. 1. Ergebnisse der Präzisionskontrolle bei der Bestimmung der Fibronectin-Konzentration im Plasma mittels Lasernephelometrie.

	Präzision in der Serie			Präzision von Tag zu Tag		
Analysenzahl	20	20	20	20	20	15
Mittelwert (mg/l)	457	243	124	478	245	125
Standardabweichung (mg/l)	8,9	3,9	3,3	18,8	14,7	18,8
Variationskoeffizient (%)	2,1	1,6	2,6	3,9	6,0	7,0

Tab. 2. Streulichtintensitäten und Fibronectinkonzentrationen in einigen Qualitätskontrollseren im Vergleich zu Humanplasma und Antiserum-NaCl-Gemisch (Volumina, 1 + 1). Die Vorverdünnungen waren für die Kontrollseren 1:21, für Humanplasma 1:51.

Kontrollseren (Hersteller)	Charge	Streulichtintensität (V)	immunreaktives Fibronectin (mg/l)
Humanes Plasma ($\bar{x} \pm 2s$)	—	1,4–2,50–3,3	180–290–400
Antiserum-NaCl	—	0,20	—
Standardhumanplasma (Behring)	502533 A	4,22	234
Moni-Trol I-E (Dade)	LTD 147 B	3,55	190
Hyland-Q Pak (Hyland)	3656 P 001 AAF	2,96	152
Seroquant A (Behring)	624103	2,68	133
Hyland P (Hyland)	P 11 E	2,58	127
Hyland N (Hyland)	1 N 05 A	2,57	126
Moni-Trol II-E (Dade)	PTD 60 A	2,40	116
Normosic (Asid)	414 B	2,17	105
Validate A (Goedecke)	64 1117	1,95	94
PKR (Asid)	402	1,58	76
Seronorm (Nyegaard)	147	1,54	74
Precilip (Boehringer)	661	1,37	65
Precinorm U (Boehringer)	839	1,36	65
Seronorm Lipid (Nyegaard)	54	0,74	34
Ortho (Ortho Diagnostics)	5 R 215	0,72	33
Ortho Abnormal (Ortho Diagnostics)	9 S 317	0,63	29
Ortho Ria Control I (Ortho Diagnostics)	3 S 407	0,51	23
Ortho Ria Control II (Ortho Diagnostics)	2 S 507	0,43	18,8
Pathonorm L (Nyegaard)	12	0,18	—
Bilirubin Control (Dade)	B; C 941	0,17	—
Precipath E (Boehringer)	833	0,14	—

Abb. 5. Statistischer Vergleich der mit der Lasernephelometrie und radialen Immundiffusion ermittelten Fibronectinkonzentrationen in 42 Patientenplasmen.
 $n = 42$; $y = 1,0434 x - 54,59$; $r = 0,859$.

(Tab. 3). Die mit Heparin antikoagulierten Plasmen weisen im allgemeinen niedrigere und stark streuende Fibronectinkonzentrationen auf. Eine lasernephelometrische nachweisbare Inhibition der Bildung des Fibronectin-Antikörper-Komplexes durch Heparin konnte bis zu einer Polyanionenkonzentration von 90 mg/l Küvetten-

Tab. 3. Vergleich der lasernephelometrisch ermittelten Fibronectin-Konzentrationen im EDTA-Plasma, Heparin-Plasma und Serum von 12 gesunden Probanden. Von 10 ml venös entnommenen Blutes wurden je 3 ml in EDTA-beschichteten Blutbildröhrchen (Fa. Sarstedt) oder Heparin-enthaltenden Gefäßen (Fa. Sarstedt) antikoaguliert. Der Rest wurde bis zur vollständigen Gerinnung 1 Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Fibronectinbestimmung erfolgte im Zentrifugationsüberstand. Die Berechnung der Signifikanzen (α) erfolgte mit dem t-Test für verbundene Stichproben.

	Heparin-Plasma	EDTA-Plasma	Serum
Mittelwert (mg/l)	178 $\alpha = 0,001$	306 $\alpha = 0,001$	245
Standard- abweichung (mg/l)	71	45	38
Variations- koeffizient (%)	40,0	14,7	15,5

inhalt nicht festgestellt werden. Bei einer Heparinkonzentration von 170 mg/l beträgt die Wiederfindung des Fibronectins noch 83%.

Als Grundlage der rechner-assistierten Auswertung der Streulichtintensitäten (Spannungen) dient die in Abbildung 4 als Beispiel dargestellte Referenzkurve. Da auf Grund ihres flachen Verlaufes mit einer Exponentialfunktion keine optimale Kurvenanpassung erreichbar

war, wurde die Kurve in 3 Bereiche aufgeteilt, für die die Regressionsgeraden (x = Spannung, y = Fibronectinkonzentration) $y = 0,975x + 0,0598$ (I), $y = 1,18x - 0,467$ (II) und $y = 1,549x - 2,258$ (III) berechnet wurden (Abb. 4). In allen drei Teilbereichen betragen die Korrelationskoeffizienten zwischen wahrer und idealisierter Kurve 0,999. Unter Berücksichtigung der Probenverdünnung wurden die Funktionen in den Rechner HP 9815 A eingegeben, der somit Meßsignale (V) und Fibronectinkonzentrationen ausdrückte.

Klinische Anwendungen

Die lasernephelometrisch im Plasma bestimmte mittlere Fibronectinkonzentration für gesunde Männer im Altersbereich zwischen 20 und 45 Jahren beträgt 291 mg/l, Frauen weisen eine signifikant niedrigere Konzentration von 259 mg/l auf (Tab. 4). Die Verteilungsfunktion konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Im Rattenplasma ($n = 10$) beträgt die mit Anti-Humanfibrinogen gemessene immunreaktive Konzentration ($\bar{x} \pm s$) des "cold-insoluble globulin" 228 ± 11 mg/l.

Stichprobenuntersuchungen ergaben für die Gruppe der Mammacarcinome ($n = 7$) und Carcinome des weiblichen Genitaltraktes (Corpus-, Collum-, Ovarialcarcinome) sowie bei Patientinnen mit Morbus Crohn signifikant erhöhte Fibronectinkonzentrationen im Plasma, wohingegen derartige Unterschiede bei Patienten mit Carcinomen des Verdauungstraktes (Ösophagus, Magen, Rektum) und mit Bronchialcarcinomen ($n = 4$) nicht nachweisbar waren (Tab. 4). Mit Ausnahme erhöhter Konzentrationen (400–500 mg/l) bei einigen Immuno-

cytompatienten ergaben sich bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen keine signifikanten Abweichungen vom Referenzwert.

Bei Synovialflüssigkeiten ($n = 40$), die nach zytologischen, klinisch-chemischen und physikochemischen Kriterien (43, 44) in nicht-entzündliche und entzündliche Ergüsse getrennt wurden, konnte in der letztgenannten Gruppe eine signifikante Zunahme der Fibronectinkonzentration festgestellt werden (Tab. 5). In nicht-entzündlichen Punktionsflüssigkeiten beträgt die mittlere Antigenkonzentration etwa nur 50% der Konzentration im Plasma. Zwischen Gesamtprotein- und Fibronectingehalt besteht statistisch kein Zusammenhang.

Ähnlich den Veränderungen in den Synovialflüssigkeiten kommt es auch in entzündlichen Liquores cerebro-spinalis zu Erhöhungen der Fibronectinkonzentrationen, deren Ausmaß stärker mit der Zellzahl ($r = 0,898$) als mit der Gesamtproteinkonzentration ($r = 0,797$) korreliert (Tab. 6). Die extrem niedrigen Antigenkonzentrationen in gesunden und pathologischen Liquores machen eine 5:1 Konzentrierung vor der Inkubation mit dem Antiserum notwendig, um Streulichtintensitäten von mindestens 0,5 V zu erhalten.

Dem Plasma vergleichbare Antigenbereiche konnten wir für die überwiegende Zahl der untersuchten Seminalplasmen feststellen (Tab. 7). Die erhebliche Variabilität der individuellen seminalen Fibronectinkonzentrationen läßt statistisch keine Beziehung ($r = 0,07$) zur Spermatozoenzahl erkennen.

Sehr niedrige, zwischen 3,4 und 24,5 mg/l (Mittelwert 16 mg/l) sich bewegende Konzentrationen des immunreaktiven Fibrinogens sind in den Amnionflüssigkeiten ($n = 6$) der 38. Schwangerschaftswoche nachweisbar, bei einer Probe aus der 18. Woche konnte jedoch eine

Tab. 4. Fibronectinkonzentrationen im Plasma gesunder Personen und Patienten mit Carcinomen und Morbus Crohn. Die Referenzbereiche wurden mit dem nicht-parametrischen Verfahren nach Murphy (39) ermittelt; die Bereiche, die 80% der Meßwerte mit $\alpha = 0,1$ umfassen und die Mittelwerte sind angegeben. Für pathologische Plasmen sind die Streubereiche und die mittleren Konzentrationen aufgeführt. Die Signifikanzen wurden mit dem t-Test für unverbundene Stichproben berechnet.

Herkunft des Plasmas	Anzahl	Fibronectin (mg/l)	Signifikanzen (α)
Gesunde männliche Erwachsene	101	229–291–379	0,01
Gesunde weibliche Erwachsene	39	196–259–360	
Carcinome des weiblichen Genitaltraktes und Mammacarcinome	13	253–332–412	0,001
Carcinome des Verdauungs- und Respirationstraktes (Männer)	19	152–275–428	0,40
Ileitis terminalis Crohn (Frauen)	8	180–302–419	0,10

Tab. 5. Konzentrationen von Fibrinogen und Gesamtprotein in Synovialflüssigkeiten nicht entzündlicher und entzündlicher Ätiologie. Die Unterscheidung zwischen beiden Gruppen von Ergüssen erfolgte nach den früher aufgestellten klinisch-chemischen, zytologischen und physikochemischen Kriterien (43, 44). Die Signifikanzen der Unterschiede (α), geprüft mit dem Wilcoxon-Test, und die Korrelationen (r) zwischen Fibrinogen- und Proteinkonzentration sind angegeben (in Klammern).

Herkunft der Synovialflüssigkeit	Anzahl	Fibronectin (mg/l)	Gesamtprotein (g/l)
$(r = 0,37)$			
Nicht-entzündlicher Erguß	23	153 ± 65	$28,5 \pm 5,8$
		$(\alpha = 0,001)$	$(\alpha = 0,001)$
Entzündlicher Erguß	17	318 ± 129	$47,9 \pm 5,2$
		$(r = 0,03)$	

Tab. 6. Fibronectin- und Gesamtproteinkonzentrationen sowie Zellzahl in normalen und pathologischen Liquores cerebrospinalis. Vor der Bestimmung wurde der Liquor 5:1 konzentriert. Die Zahl der untersuchten normalen Liquores ist in Klammern angegeben, für Gesamtprotein und Fibronectin sind Konzentrationsbereiche und Mittelwerte aufgeführt. Die Korrelationen (r) wurden berechnet.

	Zellzahl ($\frac{\mu l^{-1}}{3}$)	Fibronectin (mg/l)	Gesamtprotein (g/l)
Normaler Liquor (5)	1–2	0,22–0,41–0,56	0,20–0,42–0,45
Pathologischer Liquor	1	0,44	0,68
	10	0,23	0,30
	778	0,51	0,62
	4200	0,57	1,51
	4200	1,06	–
	6100	1,36	0,46
	37800	2,18	3,67
	r = 0,898	r = 0,797	

Tab. 7. Fibronectinkonzentration im Seminalplasma und Spermienzahl im Ejakulat von 14 Patienten.

Fibronectin (mg/l)	Anzahl der Spermien ($10^9/l$)
330	– (Vasektomie)
297	21,5
277	– (Vasektomie)
272	74,8
246	4
234	– (Vasektomie)
234	34
196	– (Vasektomie)
184	86,4
143	7,3
143	4,5
117	92
100	0,5
98	0

Konzentration von 80 mg/l gemessen werden. Aufgrund dieser geringen Antigenkonzentration haben sich 1:4 Vorverdünnungen der Amnionflüssigkeiten für die Lasernephelometrie als optimal erwiesen.

Diskussion

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die methodischen Möglichkeiten zur Quantifizierung des „cold-insoluble globulin“ in biologischen Flüssigkeiten durch Anwendung der Lasernephelometrie bedeutungsvoll erweitert werden. Das Verfahren erweist sich als präzise, empfindlich, schnell, relativ einfach, voll mechanisierbar und auf verschiedene menschliche und tierische Körperflüssigkeiten anwendbar. Präzision und Probendurchsatz können durch Adaptation einer automatischen Füllstation an das Nephelometer weiter gesteigert werden. Diese Merkmale, besonders die elektronische Auswertung der primären Meßwerte, lassen die Lasernephelo-

metrische Fibronectinbestimmung gegenüber den bisher angewandten immunologischen Verfahren (1, 15, 27–29) als vorteilhaft erscheinen. Die mit ihr ermittelten Antigenkonzentrationen zeigen teilweise eine nur ungenügende Übereinstimmung mit denen der radialen Immundiffusion (Abb. 5). Die von uns angegebenen Referenzbereiche für Fibronectin im Plasma, die in Bestätigung früherer Befunde (45, 46) geschlechtsabhängig verschieden sind, stimmen jedoch gut mit der überwiegenden Zahl der früher mitgeteilten Werte (41, 42, 47) überein.

Obwohl diese Angaben auf die Richtigkeit der Lasermethode hinweisen, muß es gegenwärtig dennoch als Nachteil angesehen werden, daß wegen Fehlens geeigneter Richtigkeitskontrollseren dieses Kriterium der analytischen Zuverlässigkeit nicht geprüft werden kann. Die Wiederfindung von nur 50% der angegebenen Konzentration einer kommerziell erhältlichen reinen Fibronectinlösung kann u. a. auf eine unrichtige Einwage seitens des Herstellers, auf Veränderungen der Immunreaktivität während der Antigenlagerung und -präparation sowie auf Störungen der Immunkomplexbildung durch Komponenten des Puffersystems zurückzuführen sein. Zur Unterstützung dieser Gründe sei betont, daß die (scheinbar) reduzierte Wiederfindung sowohl bei der Lasernephelometrie als auch bei der radialen Immundiffusion feststellbar war und somit methodenunspezifisch ist.

Klinische, diagnostische und pathobiochemische Bedeutung des Fibronectins im Plasma sind gegenwärtig noch ungewiß. Es konnte nachgewiesen werden, daß zirkulierendes Fibronectin in die gleichen Zelloberflächenstrukturen inkorporiert werden kann wie das endogen synthetisierte Glykoprotein (48). Plasmafibronectin könnte somit zum Aufbau der perizellulären Matrix solcher Zellen dienen, die zur Synthese des LETS-Protein inkompetent sind (48). Obwohl bei einigen Erkrankungen erhöhte (49–51) und erniedrigte (41, 46, 50, 52–54) Konzentrationen nachgewiesen wurden, scheint die Fibronectinkonzentration im Blut, wie auch unsere Stichprobenuntersuchungen zeigen, auffällig konstant zu sein (45). Hingegen lassen sich signifikante Erhöhungen der Fibronectinkonzentrationen in den Synovialflüssigkeiten entzündlicher Gelenkerkrankungen feststellen. Eine Korrelation der Fibronectinkonzentration mit den ätiologischen Gruppen entzündlicher Gelenkerkrankungen läßt sich nicht angeben, möglicherweise besteht aber zwischen der Konzentration des Fibronectins und der entzündlichen Aktivität ein Zusammenhang. Dieses Protein kann somit in das Spektrum der Größen eingereiht werden, die zur klinisch-chemischen Differentialdiagnostik entzündlicher und nicht-entzündlicher Gelenkergüsse herangezogen werden (43, 44). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Herkunft des synovialen Fibronectins (ortsständige Synthese oder Diafiltrat des Plasmas), seine mögliche molekulare Heterogenität (55) und die patho-

biochemische Bedeutung erhöhter Fibronektinkonzentrationen im synovialen Entzündungsprozeß zu klären.

Erstmals konnten wir den Nachweis erbringen, daß Fibronektin im Seminalplasma in einer dem Blutplasma vergleichbaren Konzentration vorkommt. Auch hier müssen umfangreichere klinische Untersuchungen prüfen, ob die in Tabelle 7 festgestellten Variationen in den seminalen Fibronektinkonzentrationen von diagnostischer und/oder pathogenetischer Aussagekraft für Fertilitätsstörungen sind.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Körperflüssigkeiten ist die immunreaktive Fibronektinkonzentration im Liquor cerebrospinalis und in der Amnionflüssigkeit sehr gering. Die lasernephelometrische Quantifizierung im Liquor gelingt nur nach Konzentrierung der Probe. Die von uns ermittelten Konzentrationen sind wesentlich niedriger als die bisher mitgeteilten, radioimmunologisch bestimmten Fibronektinkonzentrationen im Liquor cerebrospinalis (55a), was auf qualitative und/oder quantitative Unterschiede des Antigens in dem zur Kalibration verwendeten Standardplasma oder auf unterschiedliche Eigenschaften der Antikörperpräparationen zurückzuführen sein könnte.

Ein dem Plasmafibronektin immunologisch und strukturell sehr ähnliches, offenbar mit ihm aber nicht identisches Protein wurde in der Amnionflüssigkeit nachgewiesen (56, 57). Die in der Literatur angegebene Konzentration von 70 mg/l (56, 57) ist, mit Ausnahme einer Probe aus der 18. Schwangerschaftswoche, höher als der lasernephelometrisch bestimmte Konzentrationsbereich, jedoch fehlen in früheren Mitteilungen eindeutige Angaben über den Zeitpunkt der Probennahme. Wie Zellkulturversuche (57) nachweisen konnten, entsteht das Amnionfibronektin nicht durch passive Ultrafiltration des Plasmas, sondern als Syntheseprodukt der als E (epithelial cells), AF (amniotic fluid cells) und F (fibroblastic cells) bezeichneten Zelltypen der Amnion-

flüssigkeit (58). Ob diesem Konstituenten der Amnionflüssigkeit eine physiologische Bedeutung zukommt, ist unbekannt.

Als Ausdruck der phylogenetisch sehr konservativen Struktur bestehen zwischen den Fibronektinen verschiedener Tierarten ausgedehnte immunologische Kreuzreaktivitäten (1, 13, 59). Sie ermöglichen die Bestimmung der Konzentration von immunreaktivem Fibronektin in Kontrollseren tierischen Ursprungs. Jedoch muß betont werden, daß die derart ermittelte Konzentration wesentlich von der Stärke der immunologischen Kreuzreaktion beeinflusst wird und somit von der mit nicht-immunologischen Verfahren bestimmten Konzentration dieses Plasmaproteins in unterschiedlichem Ausmaße abweichen kann. Dennoch können sie, wie unsere Erfahrungen gezeigt haben, gegenwärtig aus Mangel geeigneter Kontrollplasmen zur Präzisionskontrolle herangezogen werden. Die immunologische Identität von Human- und Ratten-Plasmafibronektin (22) ausnutzend, kann die Lasernephelometrie zur Quantifizierung des Glykoproteins in diesem häufig verwendeten Versuchstier ebenso eingesetzt werden, wie zur quantitativen Bestimmung des LETS-Protein in biotisch entnommenen Gewebeproben und zur Messung der Fibronektinproduktion durch in vitro kultivierte Zellen menschlicher oder tierischer Herkunft. Die Anwendung der lasernephelometrischen Bestimmung scheint somit geeignet, die pathobiochemische und diagnostische Bedeutung dieses möglicherweise sehr wichtigen Proteins im Plasma, aber auch in anderen Körperflüssigkeiten, durch Untersuchungen an einem umfangreichen Patientengut einer Klärung näher zu bringen.

Danksagung

Für die großzügige Bereitstellung des Fibronektin-Antiserums, des Standardplasmas und der Partigen-Platten für Fibronektin möchten wir Herrn Dr. F. Dati, Behring-Werke, Marburg/Lahn, vielmals danken.

Literatur

1. Kuusela, P., Ruoslahti, E., Engvall, E. & Vaheri, A. (1976), *Immunochemistry* 13, 639–642.
2. Ruoslahti, E., Vaheri, A., Kuusela, P. & Linder, E. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 322, 352–358.
3. Gahmberg, C. G. & Hakomori, S. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3329–3333.
4. Yamada, K. & Weston, J. (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3492–3496.
5. Hynes, R. O. & Bye, J. M. (1974), *Cell* 3, 113–120.
6. Mosher, D. F. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 6614–6621.
7. Yamada, K. M. & Olden, K. (1978), *Nature* 275, 179–184.
8. Grinnell, F. (1978), *Int. Rev. Cytol.* 53, 65–144.
9. Vaheri, A., Ruoslahti, E. & Mosher, D. F. (1978), (Hrsg.) *Fibroblast Surface Protein*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 312.
10. Chen, A. B., Amrani, D. L. & Mosesson, M. W. (1977), *Biochim. Biophys. Acta* 493, 310–322.
11. Ruoslahti, E. & Vaheri, A. (1974), *Nature* 248, 789–791.
12. Engvall, E., Ruoslahti, E. & Miller, E. J. (1978), *J. Exp. Med.* 147, 1584–1595.
13. Ruoslahti, E. & Engvall, E. (1978), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 312, 178–191.
14. Dessau, W., Adelman, B. C., Timpl, R. & Martin, G. R. (1978), *Biochem. J.* 169, 55–59.
15. Engvall, E. & Ruoslahti, E. (1977), *Int. J. Cancer* 20, 1–5.
16. Balian, G., Click, E. M., Crouch, E., Davidson, J. M. & Bornstein, P. (1979), *J. Biol. Chem.* 254, 1429–1432.
17. Ruoslahti, E. & Vaheri, A. (1975), *J. Exp. Med.* 141, 497–501.
18. Yamada, K. M., Olden, K. & Pastan, I. (1978), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312, 256–277.
19. Pearlstein, E. & Gold, L. I. (1978), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312, 278–292.
20. Vuento, M. (1979), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1327–1333.
21. Yamada, K. M., Yamada, S. S. & Pastan, I. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3158–3162.
22. Molnar, J., Gelder, F. B., Ming Zong Lai, Siefring, G. E., Credo, R. B. & Lorand, L. (1979), *Biochemistry* 18, 3909–3916.
23. Kaplan, J. E., Molnar, J., Saba, T. M. & Allen, C. (1976), *J. Reticuloendothel. Soc.* 20, 375–384.

24. Wartiovaara, J., Leivo, I., Virtanen, I., Vaheri, A. & Graham, C. F. (1978), *Nature* 272, 355–356.
25. Vaheri, A., Ruoslahti, E., Westermarck, B. & Ponten, J. (1976), *J. Exp. Med.* 143, 64–72.
26. Vaheri, A. & Ruoslahti, E. (1974), *Int. J. Cancer* 13, 579–586.
27. Mancini, G., Carbonara, A. O. & Heremans, J. F. (1965), *Immunochemistry* 2, 235–254.
28. Laurell, C. B. (1966), *Anal. Biochem.* 15, 45–52.
29. Ruoslahti, E., Vuento, M. & Engvall, E. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* 534, 210–218.
30. Conrad, A., Schürmann, J., Kreutz, F. H. & Sieber, A. (1978), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 299–305.
31. Daigneault, R. & Lemieux, D. (1978), *Clin. Biochem.* 11, 28–31.
32. Töpel, M. (1979), *Lab. med.* 3, 59–64.
33. Shulman, G. (1979), *Clin. Biochem.* 12, 123–125.
34. Sieber, A. & Gross, J. (1975), *Prot. Biol. Fluids* 23, 295–298.
35. van Wersch, J., Peuckert, M. & Greiling, H. (1977), *Adv. Exp. Med. Biol.* 76A, 619–623.
36. Voigt, H. W. (1977), *Laboratoriumsblätter* 27, 168–172.
37. Sieber, A. (1977), *Laboratoriumsblätter* 27, 109–118.
38. Weichselbaum, T. E. (1946), *Am. J. Clin. Pathol.* 16, 40–48.
39. Murphy, R. B. (1948), *Ann. Math. Statistics* 19, 581–589.
40. Sachs, L. (1972), *Statistische Auswertungsmethoden*, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
41. Matsuda, M., Yoshida, N., Aoki, N. & Wakabayashi, K. (1978), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312, 74–92.
42. Mosesson, M. W. & Umfleet, R. A. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 5728–5736.
43. Greiling, H. & Kleesiek, K. (1978), *Internistische Welt* 4, 121–130.
44. Greiling, H., Kleesiek, K. & Stuhlsatz, H. W. (1979), in *Synovialflüssigkeit und synoviales Milieu* (Thumb, N., Kellner, A., Klein, G. & Zeidler, H., Hrsg.) S. 42–54, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
45. Fyrand, O. & Solum, N. O. (1976), *Thrombosis Res.* 9, 447–455.
46. Mosher, D. F. & Williams, E. M. (1978), *J. Lab. Clin. Med.* 91, 729–735.
47. Stathakis, N. E. & Mosesson, W. (1977), *J. Clin. Invest.* 60, 855–865.
48. Hayman, E. G. & Ruoslahti, E. (1979), *J. Cell. Biol.* 83, 255–259.
49. Forkman, B., Ganrot, P. O., Gennser, G. & Rannevik, G. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 89–96.
50. Bruhn, H. D. & Heimburger, N. (1976), *Haemostasis* 5, 189–192.
51. Hällen, J. & Laurell, C.-B. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 97–103.
52. Ganrot, P. O. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 83–88.
53. Johansson, B. G., Kindmark, C.-O., Trell, E. Y. & Wollheim, F. A. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 117–126.
54. Aronsen, K. F., Ekeland, G., Kindmark, C.-O. & Laurell, C.-B. (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, 127–136.
55. Clemmensen, I. & Andersen, R. B. (1979), *Abstr. IXth Europ. Kongreß für Rheumatologie*, S. 27.
- 55a. Kuusela, P., Vaheri, A., Palo, J. & Ruoslahti, E. (1978), *J. Lab. Clin. Med.* 92, 595–601.
56. Chen, A. B., Mosesson, H. W. & Solish, G. I. (1976), *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 125, 958–961.
57. Crouch, E., Balian, G., Holbrook, K., Hoehn, H. & Bornstein, P. (1978), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312, 410–413.
58. Hoehn, H., Bryant, E. M., Karp, L. E. & Martin, G. R. (1974), *Pediat. Res.* 8, 746–754.
59. Kuusela, P., Ruoslahti, E. & Vaheri, A. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 379, 295–303.

Priv.-Doz. Dr. med. A. M. Gressner
Abteilung Klinische Chemie
und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät der RWTH
Goethestraße 27–29
D-5100 Aachen

